

制癌に関する実験的研究

第 26 報

Streptolysin-O のみの産出能を有す

る溶連菌の無効性について*

金沢大学結核研究所化学部（主任：越村三郎教授）

越 村 三 郎
西 田 信 義
坂 東 勲

金沢大学医学部薬理学教室（主任：岡本肇教授）

正 印 達
南 幹 雄
角 野 光 司

（受付：昭和40年3月1日）

緒 言

1954年以来、われわれの研究室で遂行されている“溶連菌の制癌能に関する実験的研究^{1)~8)}”では溶連菌の制癌能とその Streptolysin-S 産出能との関連性の問題についていろいろの角度から考查されたところであるが、本菌の有するもう一つの性能である Streptolysin-O 産出能* についての考查はこれまで等閑に付せられていた。

最近著者の一人正印は Bernheimer 教授より

Streptolysin-O (St-O) のみを産生する C203U, Streptolysin-S (St-S) のみを産生する Blackmore, および St-O と St-S の両者を産生する C203 S の3菌株^{11), 12)}を分与されてきたので、これらに当教室保存の St-S と St-O とを産生する Sa および Su の2菌株を加えた都合5種の菌株について、制癌能の有無いかんの比較実験を行った。

実験方法ならびに成績

I. 各供試菌株の溶血毒産生能についての吟味
St-O は St-S と異なり、酸素に敏感である

が Cysteine で再活性化^{11), 12)}されること、溶連菌における St-S の産生能が RNA (またはその

* This investigation was supported, in part, by Public Health Service Research Grant No. CA-0133-03 (1964) from the National Cancer Institute.

* Ginsburg らは St-S および St-O の粗標品を用いての実験で、いずれの溶血毒も腫瘍細胞に対して cytotoxic であつたと報告しているが、溶連菌の 1% RNA 加ブイオン培養液から分離した St-S 標品の癌細胞に対する影響を検したわれわれの実験ではほとんど無害という成績⁹⁾が得られた。しかし、これらはいずれも菌自体の毒素産生能と制癌能との関係を考查したものではない。

The strains, C203S, C203U, and Blackmore, were kindly supplied by Dr. A. W. Bernheimer, New York University, to whom we wish to express our sincere thanks.

RNase-core) によって特異的に増進されること^{13), 14), 15)}, および Trypan blue が St-S 溶血に対する特異的拮抗物質である¹⁶⁾ことなどは, これまでの研究者によって確証されているところである。

そこで, この三方面からまず今回の実験に供した5種の溶連菌株について, それらの溶血毒産出の間には, どのような差異があるかを再検することとした。

表1は各菌株を50 ml あての普通ブイヨン, (pH 7.55), に24時間培養したものの遠心上清液を対象として, それぞれの溶血力におよぼすCysteineの影響関係を検した成績である。いまこの成績から推察し得るところを述べれば,

- 1) C203S および C203U での上清液ではCysteineの存在下で溶血力の増強(それぞれ65.6→99.8 H.U./ml, および 32.6→78.4 H.U./ml)が起こっていることから少なくともこの両菌株はSt-O産出性であるといえよう。しかし, Cysteine不存下のC203Sにおける65.6 H.U./ml, および C203Uにおける32.6 H.U./mlの溶血毒がSt-OとSt-Sのいずれによるかは, なお不明である。
- 2) Blackmore株での上清液で2.9 H.U./mlと検出された溶血性はSt-Sだけによるものであることは, Cysteineで活性化されていない

ことから明らかといえよう。

- 3) Sa および Su の両株での成績に対しては1)におけると同様に考えられる。

また, 表2は各菌株の1% RNA 加ブイヨン24時間培養の上清液について, その溶血力をTrypan blue との拮抗関係, さらにRNAのSt-S増産効果の方面から考査した成績であるが, ここにC203UだけがRNAの存在下でも全くSt-Sが増産されていないに對し, C203S, Blackmore, Sa および Su ではそのいずれにあってもRNA存在下で高度のSt-S増産が起こっており, しかもそれらの溶血力がTrypan blue でほとんど完全に抑圧されているという所見は, C203UがSt-S産出能を欠いていることを明示しているものといえよう。

そして同様関係の成績はまた, 表3に示したように, RNase-coreを用いた静止菌法における実験でも得られた。

すなわち, 以上の各吟味実験の成果を通じて, ここに

- a) C203S, Sa および Su 株はSt-SとSt-Oの両溶血毒を,
- b) Blackmore株はSt-Sだけを, また
- c) C203U株はSt-Oだけを産生する性質のものであることが再確認されたわけである。

II. 各種溶連菌株についての制癌実験

腫瘍細胞として Ehrlich ascites carcinoma cells を選び, 実験方法は既報の *in vitro-in vivo* 方式^{11), 12)}によった。

すなわち, 表4はその成績を示したものであつて, ここでは

- 1) St-S および St-O の両溶血毒を産生する能力を有する C203S, Sa および Su のいずれもが効果的(たとえば Sa および Su 株における a 群の実験列では[癌細胞+菌浮遊液]混液の 37°C, 90 分間インキュベートしたものの腹腔内接種を受けた10匹のマウスは60日後でも健在, また C203S 株についての実験では10匹中7匹が健在であるといった具合で

あり, また

- 2) St-S のみの産生菌である Blackmore 株も, C203S 株におけると同様に効果的であるに對し,
- 3) St-O 産生能だけしか有しない C203U 株はほとんど全く無効である, という点に注目すべきである。

ところで, 表5は以上の成績を要約したものであるが, このように本研究を通じて, ここにはじめて溶連菌が制癌効果を発揮することには, 少なくとも St-O 産出能は無縁のものであることが明示されてきたわけである。

結

Ehrlich ascites carcinoma cells を対象とした各種の溶連菌株をもつての制癌実験で次の成績が得られた：

- 1) Streptolysin-S および Streptolysin-O の両溶血毒を産生する C203S, Sa および Su

論

の3菌株と、Streptolysin-O 産生能を欠き Streptolysin-S産生能だけを有するBlackmore 株はいずれも効果的であった。

- 2) Streptolysin-O 産出能だけを有する C203U 株はほとんど全く無効であった。

文

- 1) Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, E., Bando, Y. & Hirata, R. : Japan. J. Exp. Med., 25, 93, 1955.
- 2) Shoin, S. : Japan. J. Exp. Med., 29, 529, 1959.
- 3) Koshimura, S. and Shoin, S. : GANN, 51, 309, 1960.
- 4) Okamoto, H., Fujimura, A., Hayashi, T., Nishida, N., Shimizu, R. & Koshimura, S. : GANN, 55, 225, 1964.
- 5) Okamoto, H., Koshimura, S., Hirata, R., Murasawa, K., Bando, Y. & Shimizu, R. : Z. Krebsforsch., 62, 408, 1958.
- 6) 岡本 肇 : 蛋・核・酵 (臨時増刊), 4, 47, 1959.
- 7) 越村三郎 : 医学のあゆみ, 39, 551, 1961.
- 8) Okamoto, H. : Ann. Rep. Tbc. Kanazawa, 19(3), 165, 1962.

献

- 9) Ginsburg, I. : Brit. J. Exp. Path., 40, 417, 1959.
- 10) Ginsburg, I. & Grossowicz, N. : J. Path. Bact., 80, 111, 1960.
- 11) Bernheimer, A. W. : Streptococcal Infections, McCarty, M. ed., Columbia University Press, New York, p. 19, 1954.
- 12) Dubos, R. J. : Bacterial and Mycotic Infections of Man, 3rd. Edition, p. 248, 1958.
- 13) Okamoto, H. : Japan. J. Med. Sci., IV. Pharmacol., 12 : 167, 1940.
- 14) Bernheimer, A. W. & Rodbart, M. : J. Exp. Med., 88, 149, 1948.
- 15) Bernheimer, A. W. : J. Exp. Med., 90, 373, 1949.
- 16) Ito, R. : Folia Pharmacol. Japan., 30, 124, 1940.

Table 1.
Effect of cysteine on hemolytic activity of supernatants of
streptococcal broth cultures

Strain	24-hour broth culture			
	Turbidity	Supernatant		
		pH	Hemolytic units per ml	
			in the absence of cysteine	in the presence of cysteine (0.1 %)
C203S	0.39	6.80	65.6	99.8
C203U	0.36	6.93	32.6	78.4
Blackmore	0.45	6.71	2.9	2.4
Sa	0.48	6.70	30.4	44.8
Su	0.48	6.70	33.9	60.8

The turbidity was measured at 610 $m\mu$ with a Erma photoelectric photometer, Type 4, and the pH with a pH-meter.

One hemolytic unit (1 H. U.) is the amount of hemolysin causing 50% hemolysis against 1 ml of 3% washed rabbit erythrocyte suspension after 2-hour incubation at 37° C.

Table 2.
Streptolysin-S producing property of different streptococcal
strains in view of RNA-effect

Strain	Hemolytic units per ml of supernatant of 24-hour 1% RNA broth culture	
	— *	+ * (0.002%)
C203S	19,456	1 : <20
C203U	1 : <20	1 : <20
Blackmore	1,721	1 : <20
Sa	28,260	1 : <20
Su	20,982	1 : <20

RNA= Yeast sodium ribonucleate "Merck"

* Absence (—) or presence (+) of trypan blue in 0.85% NaCl-medium of hemolytic activity test

1 : <20 = The supernatant was tested not hemolytic even in its low dilution of 1 : 20.

Table 3.
Experiments on streptolysin-S formation by resting cells
of different streptococcal strains

Strain	Amount of hemolysin (H. U. /ml) formed in	
	B. B. M. containing 0.1% RNase-core	B. B. M.
C203S	609	1 : <2
C203U	1 : <2	1 : <2
Blackmore	686	1 : <2
Sa	550	2
Su	586	33

The B. B. M. (Bernheimer's basal medium) was composed of 675 mg maltose, 6 ml 20% KH_2PO_4 (adjusted to pH 7.0 with NaOH), 12 ml 2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 66 ml distilled water.

Formation of streptolysin-S : A mixture of 1 ml of a thick streptococcal suspension and 1 ml of 0.2% RNase-core containing B.B.M. (or B. B. M.) was incubated at 37°C for 2 hours. Then, the mixture was centrifuged, and the clear supernatant was assayed for hemolytic activity.

Table 4.
Comparative anticancer experiments with 5 different strains of
Streptococcus pyogenes

The method was the same as that employed in previous studies.^{1),4)}
Both streptococci and cancer cells were suspended in B. B. M.

[Cocci-suspension + Tumor cell suspension] $\xrightarrow{37^\circ\text{C}, 90'}$ Intraperitoneal inoculation, after addition of penicillin.

On the first 3 days following the inoculation, penicillin was given subcutaneously to all mice.

Expt. No.	Strain of hemolytic streptococci	Dilution of original cocci- suspension	Animal group (10 ddN mice for each)	Results : No. of survivors/test animals after (days)			
				10	20	30	60
1	C203S	Undild.	a	10/10	9/10	9/10	7/10
		1 : 5	b	10/10	8/10	3/10	1/10
2	C203U	Undild.	a	10/10	4/10	1/10	1/10
		1 : 5	b	10/10	5/10	1/10	1/10
3	Blackmore	Undild.	a	10/10	10/10	8/10	7/10
		1 : 5	b	10/10	8/10	1/10	1/10
4	Sa	Undild.	a	10/10	10/10	10/10	10/10
		1 : 5	b	10/10	8/10	4/10	0/10
5	Su	Undild.	a	10/10	10/10	10/10	10/10
		1 : 5	b	10/10	10/10	5/10	3*/10
6	Control (without cocci)			10/10	2/10	0/10	.

* One of 3 animals gave positive tumor finding at autopsy.

Table 5.
Differences among strains of group A streptococci in regard to
production of streptolysin-S and to anticancer activity

Strain	Ability to produce		Anticancer activity
	Streptolysin-S	Streptolysin-O	
C203S	+	+	+
C203U (Mutant of C203S)	0	+	—
Blackmore	+	0	+
Sa (Nearly avirulent mutants of Sv-strain)	+	+	+
Su	+	+	+